Aus dem Röntgeninstitut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. Liechti
und dem
Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. A. von Muralt.
Arbeit unter Leitung von Pd. Dr. W. Wilbrandt.

Untersuchungen über Röntgenhæmolyse

(Erschienen in Strahlentherapie)

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

Anton Bühlmann
von Luzern.

Sonderabdruck aus „Strahlentherapie“

1943

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. Liechti von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 8. Dezember 1943.

Der Dekan der medizinischen Fakultät:
E. Glanzmann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

In einer früheren Mitteilung (Liechti und Wilbrandt 1941[1]) war eine Analyse der Röntgenhämolyse gegeben worden, aus der sich folgendes ergab. Die Röntgenbestrahlung macht die normalerweise für Kationen undurchlässige Erythrozytenmembran kationenpermeabel. Die Folge ist, daß auf Grund des Donnan-Mechanismus Salz in die Zellen eindringt und eine osmotische Schwellung verursacht. In eiweißfreien Lösungen führt dieser Vorgang zu keinem Gleichgewicht, und auch bei einem Eiweißgehalt des Außenmediums wie etwa dem des Serums läge das erreichbare Gleichgewicht bei so großem Zellvolumen, daß vorher Hämolyse eintritt. Die Hämolyse nach Röntgenbestrahlung ist also eine „kolloidosmotische" Hämolyse durch Änderung der Membranpermeabilität, ähnlich einer Reihe anderer Hämolysen, für die dieser Mechanismus neuerdings nachgewiesen wurde (Wilbrandt 1941).

Die von Holthusen (1922) beschriebene Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Röntgenhämolyse von der Art der anwesenden Salze wurde bestätigt. Es wurde aber gezeigt, daß man qualitativ die gleichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Salzen auch dann bekommt, wenn man das Blut nicht in den Salzlösungen bestrahlt, sondern erst nach der Bestrahlung in den Lösungen suspendiert, d. h. daß sich der Salzeinfluß in der Hauptsache erst in der Nachperiode auswirkt. Ob außerdem auch die während der Bestrahlung anwesenden Ionen für die Bestrahlungswirkung von Bedeutung sind, mußte noch offen gelassen werden.

Aus der kolloid-osmotischen Natur der Hämolyse ergab sich, daß den Ionenwirkungen zwei verschiedene Mechanismen zugrunde liegen: Die Kationen beeinflussen die Schwellungsgeschwindigkeit hauptsächlich auf

[1] Strahlenther. 70 (1941): 541.

Grund ihres Diffusionsvermögens, da das Eindringen der Kationen der limitierende Faktor für die Schwellungsgeschwindigkeit ist. Sie ordnen sich diesbezüglich in die Reihe K>Na>Li>Ba>Mg. Die Anionen dagegen, deren Permeationsgeschwindigkeit auf jeden Fall groß ist gegenüber der der Kationen, beeinflussen offenbar die Hämolysegeschwindigkeit durch Änderung der Membranpermeabilität. Am stärksten fördernd wirkt SCN, dann folgen NO_3, J, Cl und SO_4.

Die Wirkung der Bestrahlung wurde auf Denaturierung von Membraneiweiß zurückgeführt. Dafür sprach neben der aus ultramikroskopischen Beobachtungen zu schließenden eiweißdenaturierenden Wirkung der Röntgenstrahlen (Rajewsky) vor allem die Tatsache, daß auch andere eiweißdenaturierende Agenzien wie Wärme, Alkohol, Äther, Azeton und Chloroform zu osmotischer Hämolyse führen. Ferner verändert Rhodanid, das die Röntengenhämolyse am stärksten fördert, auch ohne Bestrahlung schon die Erythrozytenpermeabilität in der gleichen Richtung, wenn auch schwächer. Rhodanid gehört aber zu einer Reihe von Ionen, die ebenfalls Eiweiß denaturieren. Die stark fördernde Wirkung des Rhodanids ist daher vermutlich nicht in einer Sensibilisierung der Zellen gegen die Bestrahlung begründet, sondern eher in gleichgerichteten Wirkungen von Anion und Bestrahlung, die sich addieren. Daneben ließen die bisherigen Untersuchungen aber auch die Möglichkeit offen, daß die Anionenwirkung das eigentlich wesentliche permeabilitätsändernde Agens ist und daß die Bestrahlung die Membran gegen diese Ionenwirkung sensibilisiert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit einer Weiterführung der Analyse der Ionenwirkungen. Mehrere Versuche wurden angestellt, um die Annahme einer Eiweißdenaturierung an der Zellmembran weiter zu prüfen. Ferner sollte unter anderem untersucht werden, ob neben der ausgesprochenen Ionenwirkung in der Nachperiode sich auch eine Abhängigkeit der Röntgenhämolyse von der Art der während der Bestrahlung anwesenden Ionen nachweisen ließ. Die quantitativen Beziehungen zwischen Ionenwirkung und Bestrahlung wurden näher untersucht in der Hoffnung, ein klareres Bild über die Natur des Synergismus zu bekommen. Schließlich wurde die Frage geprüft, ob die Entstehung einer hämolysierenden Substanz an der Röntgenhämolyse beteiligt ist.

Methodik

Die photoelektrische Methodik der Aufnahme der osmotischen Resistenzkurven war die gleiche wie bei den Versuchen der vorhergehenden Mitteilung (siehe Wilbrandt 1938). Das verwendete Blut war ausschließlich defibriniertes Rinderblut, das im Eisschrank aufbewahrt

wurde. Es wurde nur Blut verwendet, das bei der Schlachtung in Glasgefäßen aufgefangen und ausschließlich in solchen aufbewahrt worden war. Dies sei deshalb besonders erwähnt, weil wir die Erfahrung gemacht haben, daß Blut, das sich eine Zeitlang in Metallgefäßen befand, spontan langsame osmotische Hämolyse zeigt, so daß es nach wenigen Tagen unbenutzbar wird. Blut, das nur mit Glas in Berührung war, hielt sich dagegen meistens im Eisschrank eine Woche oder länger in vorzüglichem Zustand. Immerhin haben wir auch bei Einhaltung dieser Vorsichtsmaßregel gelegentlich beträchtliche Unterschiede in der Reaktion verschiedener Blutproben beobachtet, ohne daß immer ein Grund dafür aufzufinden war. Quantitative Vergleiche können daher nur im Rahmen ein und derselben Versuchsreihe angestellt werden.

Die Bestrahlungstechnik war die gleiche wie früher (Dosis etwa 3000 r pro Min.). Stets wurde Vollblut bestrahlt und erst nach der Bestrahlung im Verhältnis 1:10 auf die Versuchslösungen verteilt. Die so erhaltenen Suspensionen wurden immer bei Eisschranktemperatur (etwa 6° C) aufbewahrt. Die Bestrahlungswirkung ist bei dieser Temperatur optimal (siehe vorige Mitteilung), und damit verbindet sich der weitere Vorteil, daß die Suspensionen ohne Störung durch bakterielles Wachstum über Tage verfolgt werden können. Man erhält auf diese Weise ein sehr gutes Bild von der zeitlichen Entwicklung der Änderung.

1. Die Frage der Eiweißdenaturierung

A. Die Wirkung von Säure und Alkali

Die in der vorhergehenden Mitteilung geäußerte Vermutung, daß die Röntgenwirkung auf einer Denaturierung von Membraneiweiß beruht, wurde u. a. damit begründet, daß eine Reihe anderer eiweißdenaturierender Agenzien ebenfalls osmotische Hämolyse bewirken.

Es wurde nun im Anschluß daran untersucht, ob auch Säure und Alkali, die zu den bekanntesten Eiweißdenaturantien gehören, am Erythrozyten Kationenpermeabilität auslösen, d. h. ob auch die Säure- und Alkalihämolyse kolloidosmotische Hämolysen sind. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen. Isotonische Kaliumchloridlösungen (0,16 mol.) wurden in verschiedenen Verhältnissen mit doppelt isotonischer HCl- bzw. KOH-Lösung (0,32 mol.) gemischt und zu diesen Gemischen gleiche Mengen Blut zugesetzt. Man erhält so nach Einstellung des Puffergleichgewichts Blutsuspensionen in etwa isotonischem Milieu. In den Suspensionen wurde mit einer Glaselektrode das pH bestimmt, worauf sie bei 6° aufbewahrt und in regelmäßigen Zeitabständen auf ihre osmotische Resistenz untersucht wurden. Dabei ergab sich das in Bild 1 wiedergegebene Verhalten. Bei etwa neutraler Reaktion (pH 7,27) ändert

sich die osmotische Resistenz nicht oder wenig. Bei stark alkalischer (pH 10,23) oder saurer Reaktion (pH 4,80) dagegen verschiebt sich die Resistenz seitlich nach dem Typ der osmotischen Hämolyse. Rückt das pH weiter vom Neutralpunkt weg ins Alkalische oder Saure, so erfolgt die

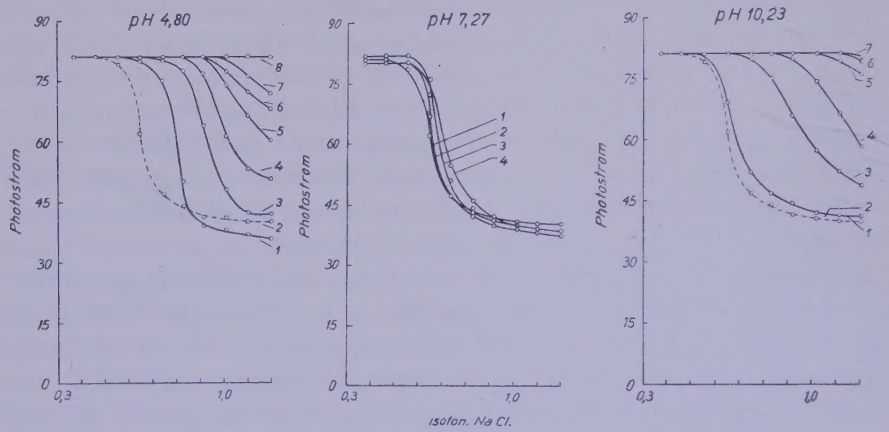

Bild 1. Osmotische Natur der Säure- und Alkalihämolyse
Änderung der osmotischen Resistenz unbestrahlten Blutes
bei saurer und alkalischer Reaktion.

	Zeiten:							
Kurve Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
pH 4,80	0	—	5	7	10	12	14,5	34 Stunden
pH 7,27	0	23	54	82	—	—	—	— Stunden
pH 10,23	0	—	3	6	12	23	34	— Stunden

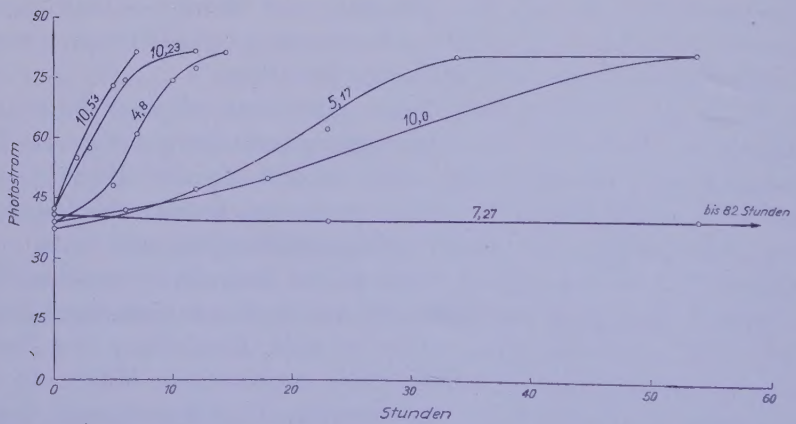

Bild 2. Geschwindigkeit der Säure- und Alkalihämolyse
Geschwindigkeit der Resistenzänderung in unbestrahlten Blutsuspensionen von verschiedenem pH. Ordinate: Photometrische Ablesungen in 1,0 isotonisch NaCl. Abszisse: Zeit. Die Zahlen an den Kurven bezeichnen das pH.

Resistenzverschiebung schneller, aber ohne Änderung des osmotischen Typs. Bild 2 zeigt die Geschwindigkeit der Verschiebung (Ablesungen in nur einer Salzkonzentration, gegen die Zeit aufgetragen) für verschiedene pH-Werte. Schon bei pH 5,17 und pH 10,0 ist die Verschiebung bemerkbar.

Die Versuche zeigen, daß die Säure- und Alkalihämolyse ebenfalls osmotische Hämolysen durch Änderung der Ionenpermeabilität sind. Sie bilden damit eine weitere Stütze für die Annahme, daß Eiweißdenaturierung an der Zellmembran Kationenpermeabilität bewirkt und daß die Röntgenhämolyse ebenfalls auf Eiweißdenaturierung beruht.

B. Die Wirkung von Salizylat

Unter den eiweißdenaturierenden Anionen ist eines der wirksamsten das Salizylat. Für die Theorie der Denaturierung hat es dadurch besondere Bedeutung erlangt, daß die Reversibilität der Denaturierung mit Salizylat von Anson und Mirsky (1934) in besonders überzeugender Weise gezeigt wurde. Sie konnten denselben Denaturierungsgrad durch Erhöhen oder Senken der Salizylatkonzentration erzielen, wenn die Endkonzentration die gleiche war, d. h. das Gleichgewicht zwischen nativem und denaturiertem Eiweiß von beiden Seiten her erreichen.

Bild 3 zeigt Versuche mit unbestrahlten und bestrahlten Blutsuspensionen in isotonischen Lösungen von Kaliumrhodanid und Natriumsalizylat. In beiden Lösungen erfolgt osmotische Schwellung, und zwar auch schon beim unbestrahlten Blut. Bestrahlung beschleunigt die Schwellung, aber nicht beträchtlich. In Kaliumrhodanidlösung ist die Schwellungsgeschwindigkeit beträchtlich größer, was auf die Wirkung des Kaliums zu beziehen ist. (Versuche in Kaliumsalizylatlösung werden in der folgenden Mitteilung im Zusammenhang mit dem Einfluß ultravioletter Bestrahlung wiedergegeben werden.) Salizylat bewirkt also in gleicher Weise wie Rhodanid Kationenpermeabilität am Erythrozyten.

Im Hinblick auf den Nachweis der reversiblen Eiweißdenaturierung durch Salizylat war nun die Frage von besonderem Interesse, ob auch die durch Salizylat ausgelöste Kationenpermeabilität reversibel ist. Sie wurde folgendermaßen geprüft. Bestrahltes und unbestrahltes Blut wurden in Kaliumsalizylatlösung suspendiert und bei 6° C aufbewahrt. Nach 4 Stunden wurde die Hälfte der Suspension zentrifugiert, die Kaliumsalizylatlösung abgesaugt und durch Kaliumchloridlösung ersetzt. Nach weiteren 4 Stunden bei 6° wurde die Hälfte dieser Suspension nochmals zentrifugiert und die Chloridlösung wieder durch Salizylatlösung ersetzt. In allen Suspensionen wurde die osmotische Resistenz verfolgt.

Bild 4 zeigt die photometrischen Ablesungen in 0,8 isotonischer Natriumchloridlösung. Die rasche Schwellung in Salizylat hört nach dem ersten Wechsel in der Chloridlösung auf, um nach dem zweiten Wechsel in Salizylat wieder mit etwa gleicher Geschwindigkeit einzusetzen. Die nicht gewechselten Suspensionshälften behalten jeweils ihre Schwellungs-

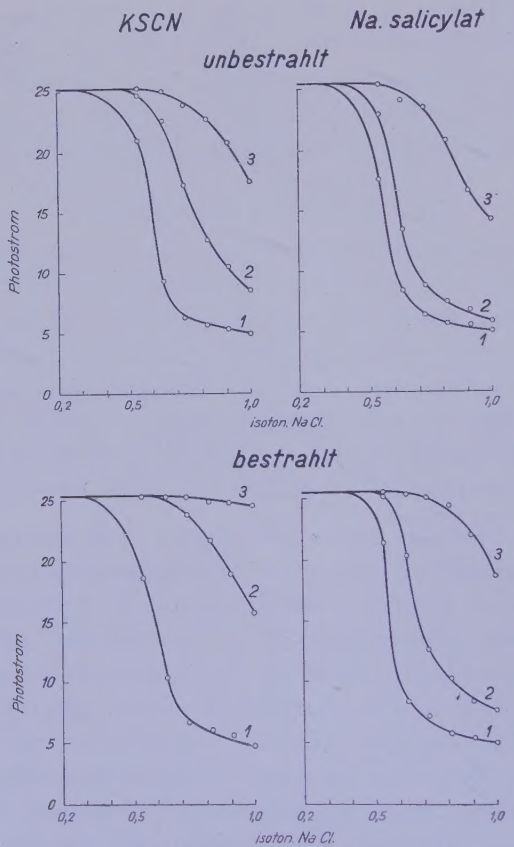

Bild 3. Wirkung von Salizylat

Änderung der osmotischen Resistenz unbestrahlten und bestrahlten Blutes (36 000 r) in Kaliumrhodanid- und Natriumsalizylatlösung. Zeiten: Kurve Nr. 1 = 1, 2 = 9, 3 = 23,5 Stunden.

geschwindigkeit bei. Der Einfluß des Salizylats auf die Schwellungsgeschwindigkeit erweist sich also in der Tat als reversibel, so daß die Versuche mit Salizylat als besonders wichtige Stütze der Denaturierungsannahme betrachtet werden können.

Daneben zeigen die Versuche, daß der jeweils einer Anionenart entsprechende Permeabilitätsgrad sich sehr rasch einstellt. Die Latenzzeit

der Röntgenhämolyse ist also offenbar nicht durch langsame Entwicklung der Kationenpermeabilität bedingt, wie man nach den Versuchen der ersten Mitteilung noch annehmen konnte. Sie ist vielmehr die Zeit, die

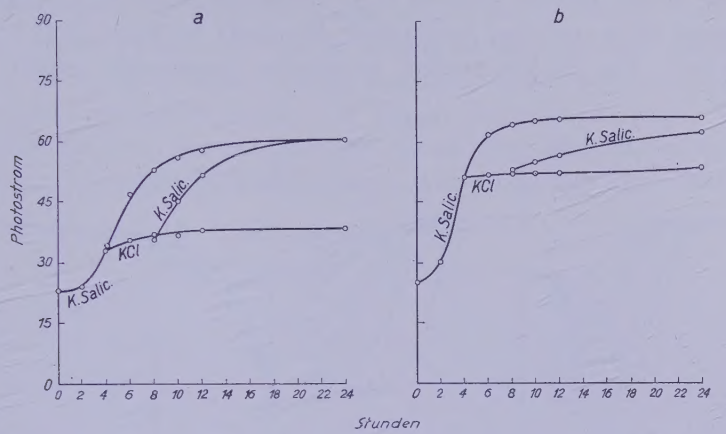

Bild 4. Reversibilität der Salizylatwirkung auf die Membranpermeabilität

Ordinate: Ablesungen in 0,8 isotonisch NaCl bei wiederholtem Wechsel der Suspensionslösung. Abszisse: Zeit. a) Unbestrahltes Blut, b) röntgenbestrahltes Blut (60 000 r). Näheres im Text.

das Eindringen des Salzes benötigt, um die osmotische Schwellung der Zellen bis zum kritischen hämolytischen Volumen zu bringen. Dasselbe geht auch aus den unten wiedergegebenen Zeitkurven der Hämolyse in verschiedenen Salzlösungen (Bild 9) hervor.

C. Der Zeitfaktor

Im Anschluß an den Nachweis der Reversibilität der Anionenwirkung wurde die Frage geprüft, ob sich auch die durch die Bestrahlung gesetzte Änderung rückbilden läßt, ob die Erythrozyten sich also von der Bestrahlung „erholen" können. Bei zahlreichen anderen Röntgenwirkungen ist das der Fall, was daraus hervorgeht, daß die gleiche Strahlendosis, auf einmal oder in Intervallen appliziert, verschieden wirkt, und zwar immer stärker bei der Verabreichung auf einmal. Das Verhältnis der beiden Strahlenmengen $\frac{\text{Dosis auf einmal}}{\text{Dosis in Intervallen}}$ für gleiche Wirkung, der sog. „Zeitfaktor", ist immer kleiner als eins, wenn zeitliche Empfindlichkeitsänderungen berücksichtigt werden.

Für die Röntgenstrahlenwirkung auf die Erythrozytenpermeabilität läßt sich dasselbe nachweisen. Die gleiche Dosis von 135000 r wurde

einer Blutprobe in drei Etappen (je 15 Min. Bestrahlung), morgens, mittags und abends, verabreicht, einer zweiten auf einmal (45 Min. Bestrahlung) abends, also gleichzeitig mit der dritten Etappe der anderen Blutprobe. Beide Proben wurden dann in isotonischer Kaliumchloridlösung suspendiert und ihre osmotische Resistenz verfolgt. Bild 5 zeigt das Ergebnis. Die in Intervallen bestrahlte Suspension ändert ihre

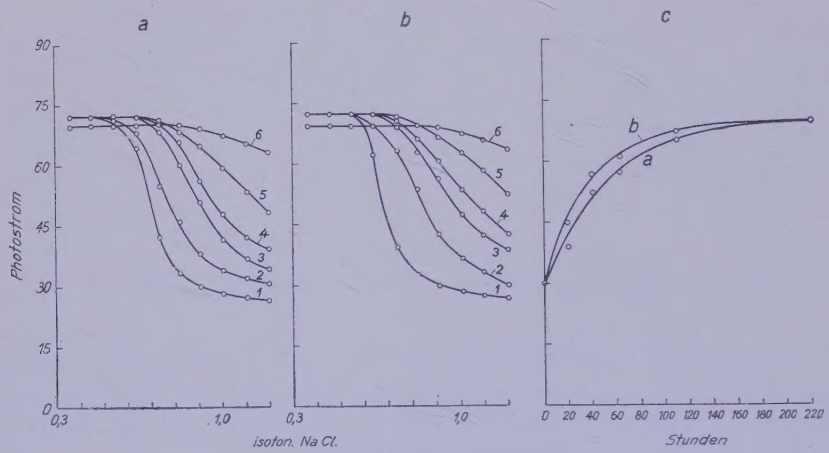

Bild 5. Der Zeitfaktor

Änderung der osmotischen Resistenz nach Bestrahlung mit 135 000 r: a) in drei Etappen zu 45 000 r, b) auf einmal. Zeiten: Kurve Nr. 1 = 0, 2 = 18,5, 3 = 40, 4 = 64, 5 = 111, 6 = 229 Stunden. c) Ablesungen von a und b in 0,9 isotonisch NaCl gegen die Zeit aufgetragen.

Resistenz anfangs deutlich langsamer als die andere, obwohl die Erythrozyten nach den ersten beiden Bestrahlungen im Vollblut schon Gelegenheit hatten, zu schwellen. Die Kationenpermeabilität in dieser Suspension ist also schwächer als in der anderen, der Zeitfaktor kleiner als eins. Im späteren Verlauf verwischt sich dann der Unterschied und die beiden Schwellungsgeschwindigkeiten gleichen sich einander an. Die Zeitkurven in Bild 5c (Ablesungen in 0,9 isotonisch Kochsalz gegen die Zeit aufgetragen) zeigen das Verhalten besonders deutlich. Der Unterschied ist allerdings nicht groß. Nimmt man die reziproke Zeit bis zur Ablesung 60 als Maß der Kationenpermeabilität, was bei dem ungleichen Verlauf der beiden Kurven natürlich willkürlich ist, so sind die entsprechenden Werte $^1/_{54}$ und $^1/_{72}$ und der Zeitfaktor ergibt sich zu 0,75. Je höher die Ablesung, die man als Test wählt, desto kleiner wird der Wert des Zeitfaktors, vielleicht deshalb, weil auch in der Kaliumchloridlösung sich in beiden Suspensionen der Bestrahlungseffekt noch zurückbildet.

2. Weitere Versuche über die Beziehung zwischen Ionen- und Bestrahlungswirkung

A. Die Wirkung der Ionen während der Bestrahlung

Daß die Ionenwirkung sich hauptsächlich auf die Nachperiode bezieht, wurde in der vorhergehenden Mitteilung dadurch gezeigt, daß Erythrozyten, die in der gleichen Lösung bestrahlt, dann aber in verschiedenen Lösungen suspendiert werden, in diesen verschieden schnell schwellen und daß die Unterschiede qualitativ die gleichen sind, wie wenn das Blut in diesen Lösungen bestrahlt worden wäre. Um nun aber festzustellen,

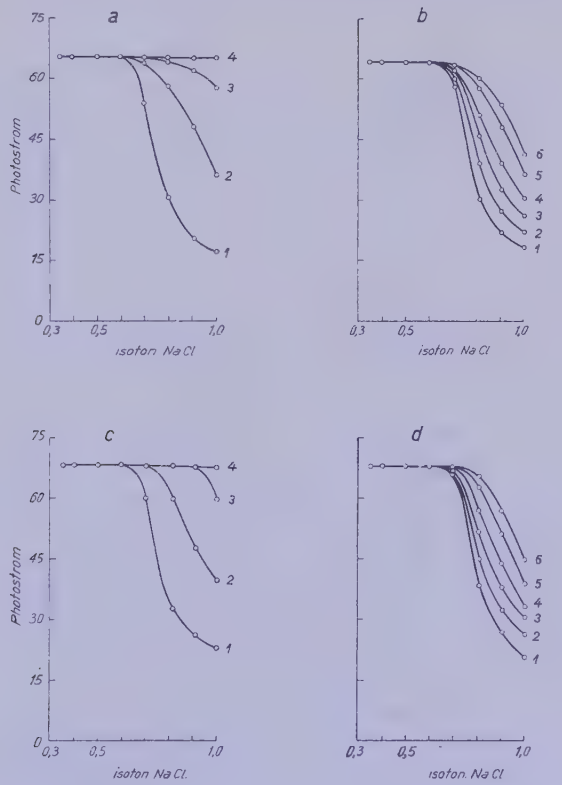

Bild 6. Einflußlosigkeit der während der Bestrahlung anwesenden Anionen

Änderung der osmotischen Resistenz bestrahlten Blutes

a) Bestrahlung in KSCN, nachher Suspension in KSCN
b) Bestrahlung in KSCN, nachher Suspension in KCl
c) Bestrahlung in KCl, nachher Suspension in KSCN
d) Bestrahlung in KCl, nachher Suspension in KCl

Isotonische Lösungen. Zeiten: Kurve Nr. 1 = 0, 2 = 6, 3 = 12, 4 = 24, 5 = 48, 6 = 60 Stunden.

ob den während der Bestrahlungsperiode selbst anwesenden Ionen überhaupt eine Wirkung auf das Bestrahlungsergebnis zukommt, war die umgekehrte Versuchsanordnung erforderlich: Bestrahlung in verschiedenen Lösungen, Nachperiode in der gleichen Lösung. Zu diesem Zweck wurde nicht Vollblut bestrahlt, sondern zwei Blutsuspensionen in zwei verschiedenen Salzlösungen. Sofort nach der Bestrahlung wurden sie in zwei Hälften geteilt, zentrifugiert, die Lösungen abgesaugt und durch je eine der beiden Salzlösungen ersetzt. So wurden vier Suspen-

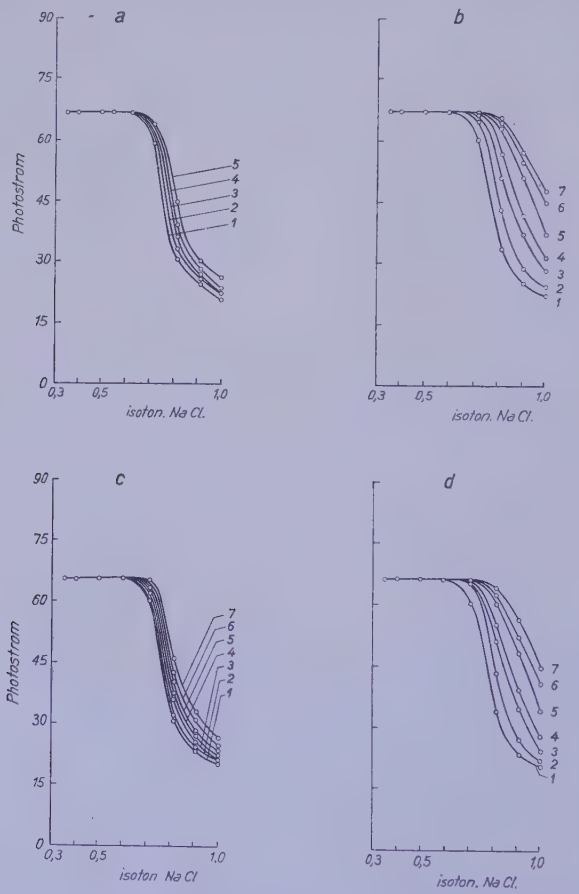

Bild 7. Einflußlosigkeit der während der Bestrahlung anwesenden Kationen Änderung der osmotischen Resistenz bestrahlten Blutes

a) Bestrahlung in LiCl, nachher Suspension in LiCl
b) Bestrahlung in LiCl, Suspension in KCl
c) Bestrahlung in KCl, nachher Suspension in LiCl
d) Bestrahung in KCl, nachher Suspension in KCl

Isotonische Lösungen. Zeiten: Kurve Nr. 1 = 0, 2 = 16, 3 = 18, 4 = 30, 5 = 54, 6 = 78, 7 = 102 Stunden.

sionen erhalten, von denen je zwei in der gleichen Lösung bestrahlt, aber nach der Bestrahlung in verschiedenen Lösungen suspendiert waren. Sie wurden bei 6° aufbewahrt und ihre osmotische Resistenz verfolgt.

Bild 6 zeigt einen solchen Versuch mit Kaliumrhodanid und Kaliumchlorid. Es ergibt sich, daß nur das Anion der Nachperiode die Schwellungsgeschwindigkeit beeinflußt: die in der Nachperiode in der gleichen Salzlösung suspendierten Erythrozyten schwellen gleich schnell, unabhängig davon, in welcher Lösung sie bestrahlt wurden. Die während der Bestrahlung anwesenden Anionen üben also auf das Bestrahlungsergebnis keinen mit der hier verwendeten Methodik nachweisbaren Einfluß aus.

Das gleiche gilt für die Kationen K und Li, wie der in Bild 7 wiedergegebene, genau in gleicher Weise durchgeführte Versuch zeigt.

Der schon aus den Versuchen der vorherigen Mitteilung gezogene Schluß, daß eine Strahlensensibilisierung durch die Ionen nicht besteht, erfährt dadurch eine weitere Stütze.

B. Das Verhalten in Saccharoselösung

Suspendiert man bestrahltes Blut in isotonischer Saccharoselösung, so erhält man keine Hämolyse, auch keine osmotische Schwellung, sondern osmotische Schrumpfung durch Austritt von Salz (Ting und Zirkle 1940). Die Erythrozyten werden also nicht permeabel für Saccharose, wohl aber für Kationen. Da aber Erythrozyten auch ohne Bestrahlung in Saccharoselösung kationenpermeabel werden (Davson 1939, Wilbrandt 1940a), müssen die Schrumpfungsgeschwindigkeiten bestrahlten und unbestrahlten Blutes in Saccharoselösung miteinander verglichen werden. Bild 8 zeigt zwei solche parallele Versuchsreihen. Die Schrumpfungsgeschwindigkeit ist beträchtlich größer in der bestrahlten Suspension, d. h. die Wirkung der Bestrahlung auf die Ionenpermeabilität läßt sich auch in Saccharosesuspension nachweisen. Auf die eingangs erwähnte und in der vorhergehenden Mitteilung erörterte Frage, ob der Synergismus zwischen Anionen und Bestrahlung vielleicht so zu deuten ist, daß die Bestrahlung die Membran nur gegenüber den Ionen sensibilisiert, liefern die Versuche jedoch leider keine Antwort, denn Anionen sind im Inneren der Zellen auch in Saccharoselösung vorhanden und auch außen bleibt eine geringe Anionenkonzentration bestehen. Auch ein Vergleich der Bestrahlungswirkung auf die Geschwindigkeit der Salzverschiebung in Saccharoselösung und in Salzlösung, etwa in der Form: In welcher Lösung beschleunigt Bestrahlung die schon spontan ablaufende Salzdiffusion stärker? führt zu keinem Ergebnis, weil dieser Beschleunigungsfaktor von Salz zu Salz verschieden ist. Auf diese Verhältnisse wird im nächsten Abschnitt näher einzugehen sein.

Dagegen sind die Versuche des Bild 8 noch in anderer Hinsicht interessant. Es wurde in der vorhergehenden Mitteilung darauf hingewiesen, daß die Resistenzkurven sich bei der Röntgenhämolyse nicht streng parallel verschieben, sondern unter Abschrägung des steilen Kurventeils, und daß diese Abschrägung als Ausdruck dafür anzusehen sei, daß nicht alle Zellen gleich schnell schwellen, sondern daß eine gewisse Streubreite der Schwellungsgeschwindigkeit besteht. Versuche, die diese Deutung belegen, werden in einer späteren Mitteilung wiedergegeben werden. In den Kurven der vorliegenden Arbeit ist diese Abschrägung wieder mit großer Regelmäßigkeit zu sehen, zumal in den meisten Versuchen eine größere Anzahl von Stadien untersucht wurden. Es wurde nun in der

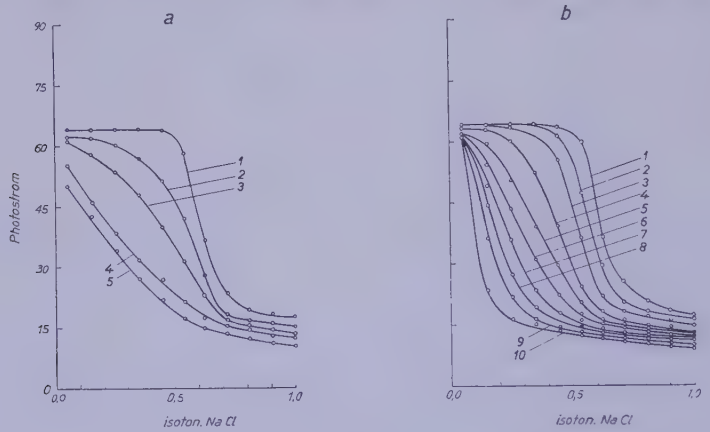

Bild 8. Wirkung von Saccharose

Änderung der osmotischen Resistenz unbestrahlten und bestrahlten Blutes, in isotonischer Saccharoselösung suspendiert. Dosis 135 000 r.

a) Unbestrahlt. Zeiten: Kurve Nr. 1 = 0, 2 = 6, 3 = 12, 4 = 24, 5 = 36 Stunden.
b) Bestrahlt. Zeiten: Kurve Nr. 1 = 0, 2 = 1, 3 = 2, 4 = 3,5, 5 = 5, 6 = 7, 7 = 9, 8 = 12, 9 = 15, 10 = 25 Stunden.

ersten Mitteilung die Frage aufgeworfen, ob diese Streuung in der Schwellungsgeschwindigkeit auf einer Streuung im Bestrahlungseffekt im Sinn der Treffertheorie oder auf einer Variabilität der Strahlenresistenz der Zellen beruht. In dieser Hinsicht liefern nun die Versuche des Bild 8 überraschende Ergebnisse.

Zunächst zeigt die Kurvenschar des bestrahlten Blutes, daß nach anfänglicher Abschrägung schließlich Kurven erreicht werden, die zur ursprünglichen wieder streng parallel verlaufen, d. h. alle Zellen erreichen offenbar im Gleichgewicht das gleiche Volumen, aber sie erreichen es mit verschiedener Geschwindigkeit. Vergleicht man nun aber die Streuung

beim bestrahlten und beim unbestrahlten Blut, so findet man sie beim bestrahlten nicht stärker, sondern beträchtlich geringer als beim unbestrahlten. Hier besteht ohne Bestrahlung eine beträchtliche Streubreite der Salzdiffusionsgeschwindigkeit und die Wirkung der Bestrahlung besteht außer in einer Beschleunigung der Diffusion in einer Vereinheitlichung der Diffusionsgeschwindigkeiten. Diese merkwürdige Beobachtung kann ihre Ursache darin haben, daß zwei streuende Eigenschaften, nämlich die Kationenpermeabilität in Saccharose ohne Bestrahlung und die Strahlenresistenz, nicht unabhängig voneinander sind, sondern daß die in Saccharose stärker permeablen Zellen resistenter gegen die Strahlung sind. Für eine Streuung nach dem Mechanismus der Trefftheorie könnte eine solche Korrelation nicht angenommen werden.

Dagegen wäre eine gewisse Verminderung der Streuung auch dann zu erwarten, wenn die Strahlenwirkung an allen Zellen den gleichen Grad von Kationenpermeabilität auslösen würde. Die Verteilungskurve der Permeabilität würde sich dann parallel gegen höhere Permeabilitätswerte verschieben, wodurch die relative Streubreite verkleinert würde. Jedenfalls spricht die Beobachtung gegen die Annahme, die Abschrägung sei der Ausdruck einer ungleichen Trefferverteilung.

Im Zusammenhang damit wurde auch an die Möglichkeit gedacht, daß durch die Bestrahlung ein wasserlöslicher Stoff entsteht, der die Zellen kationenpermeabel macht, eine Art Hämolysin. Solche Hämolysine wie Saponin u. a. bewirken an Rinderblut gleichmäßige Kationenpermeabilität aller Zellen, d. h. parallele Verschiebung der Resistenzkurven (Wilbrandt 1941). Es war daher denkbar, daß die Änderung der Kurvenform beim bestrahlten Blut auf der Wirkung eines solchen Hämolysins beruht. Diese Möglichkeit war um so mehr zu erwägen, als für die Ultravioletthämolyse Angaben über die Mitwirkung eines Hämolysins im Schrifttum vorliegen (Koeppe 1926, Giaume und Poulon 1929). Über die experimentelle Prüfung dieser Frage wird weiter unten berichtet. Sie verlief völlig negativ, ebenso allerdings auch der Versuch, bei der Ultravioletthämolyse die von Koeppe und anderen behauptete stoffliche Auslösung der Hämolyse zu bestätigen.

C. Weitere Versuche über die Bedeutung der Anionen

Die Reihenfolge, nach der die Anionen die Kationenpermeabilität begünstigen, wurde in der vorhergehenden Mitteilung folgendermaßen angegeben: $SCN > NO_3 > J > Cl > SO_4$, wobei bezüglich der Stellung des Nitrats und des Sulfats auf später zu veröffentlichende Versuche verwiesen wurde. Diese sollen nur hier wiedergegeben werden zusammen mit solchen in Chlorid- und Rhodanidlösung. Gleichzeitig mit den bestrahlten

Suspensionen wurden unbestrahlte verfolgt, um den Einfluß der Bestrahlung bei den verschiedenen Salzen quantitativ erfassen und daraus Schlüsse auf das Wesen des Synergismus zwischen Anionen und Bestrahlung ziehen zu können.

Bild 9 zeigt die Versuche in Form von Zeitkurven (je nur eine photometrische Ablesung in einer Salzkonzentration gegen die Zeit aufgetragen). Zunächst wird bezüglich Nitrat und Sulfat die angegebene Stellung in der Reihe begründet, für die bisher noch keine experimentellen Belege gegeben wurden. Ferner zeigen die Kurven, die dank dem Arbeiten bei Eisschranktemperatur über sehr lange Zeiten verfolgt werden konnten, daß das unbestrahlte Blut nicht nur in Rhodanidlösung osmotisch schwillt, wie bereits in der vorhergehenden Mitteilung gezeigt

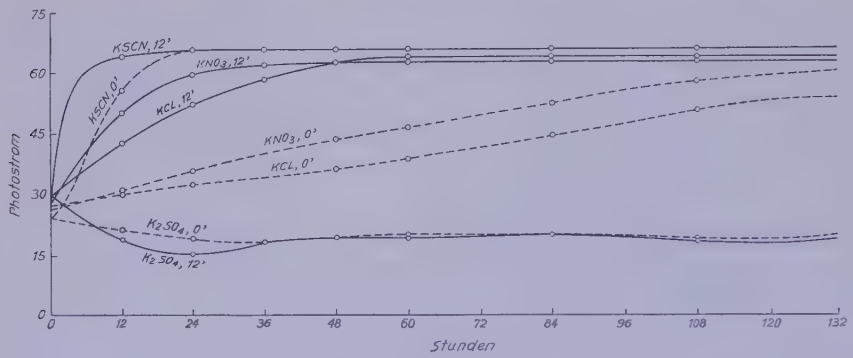

Bild 9. Wirkung verschiedener Salze

Zeitlicher Verlauf der osmotischen Schwellung bestrahlten und unbestrahlten Blutes in isotonischen Lösungen verschiedener Salze. Die Zahlen an den Kurven geben die Bestrahlungszeit an. Dosis: 3000 r pro Minute.

wurde, sondern weniger stark auch in den anderen Lösungen der einwertigen Salze, und zwar nach der gleichen Reihe abnehmend, nach der die Schwellung des bestrahlten Blutes begünstigt wird. Der aus der Schwellung unbestrahlter Blutzellen in Rhodanidlösung gezogene Schluß, daß das Zusammenwirken zwischen Anionen und Bestrahlung nicht auf einer Strahlensensibilisierung durch die Anionen beruhe, sondern eher umgekehrt auf einer Sensibilisierung gegen die Ionenwirkung durch die Bestrahlung oder aber auf Additivität gleichgerichteter Wirkung, erfährt dadurch eine weitere Stütze.

Für die Alternative: Sensibilisierung oder Additivität ist nun die Tatsache von besonderer Bedeutung, daß, wie Bild 9 zeigt, in Sulfatlösung weder beim bestrahlten noch beim unbestrahlten Blut trotz langer Beobachtungszeit eine Schwellung zu beobachten ist (die anfängliche Senkung

der Ablesungen beruht hauptsächlich auf der osmotischen Wirkung des Austauschs SO_4/Cl). In der Nachperiode anwesendes Sulfat macht also die vorgängige Bestrahlung völlig unwirksam. Eine reine Additivität zwischen Bestrahlung und Anionenwirkung ohne Wechselbeziehung kann danach offenbar nicht vorliegen, denn dann müßte bei Anwesenheit des unwirksamen Anions Sulfat die Wirkung der Bestrahlung sich noch unvermindert bemerkbar machen, und zwar in nicht viel schwächerem Ausmaß als etwa beim Chlorid, das ohne Bestrahlung auch nur sehr geringe Kationenpermeabilität auslöst. Man muß also schließen, daß ohne die Anwesenheit geeigneter Anionen die Bestrahlung zu gar keiner Membranänderung führt, und daß es die Ionenwirkung ist, die direkt die Permeabilitätsänderung auslöst. Die Bestrahlung macht die Membran gegen diese Wirkung empfindlicher, spielt also offenbar tatsächlich nur die Rolle eines Sensibilisators.

Die Sensibilisierung wirkt sich nun quantitativ nicht bei allen Anionen gleich stark aus. Nimmt man als Maß der Sensibilisierung das Verhältnis der Schwellungsgeschwindigkeiten bestrahlt : unbestrahlt, so zeigt schon die Betrachtung des Bild 9, daß, so definiert, die Sensibilisierung stärker ist bei NO_3 und Cl und schwächer bei SCN. Die Zahlen der folgenden Tabelle, in der als reziprokes Maß der Schwellungsgeschwindigkeit die Zeit bis zu einer bestimmten photometrischen Ablesung angegeben ist, bringt dasselbe quantitativ zum Ausdruck.

Salz	Ablesung	Zeit		
		a = bestrahlt	b = unbestrahlt	b:a
KSCN	57	4	12,8	3,2
KNO_3	57	19,6	108	5,5
KCl	42	11,6	76	6,5

Die Sensibilisierung ist am stärksten bei denjenigen Ionen, die ohne Bestrahlung am schwächsten wirken, während die Wirkung von Ionen, die an sich schon kräftige Kationenpermeabilität auslösen, durch die Bestrahlung nur noch wenig verstärkt wird. Dasselbe trifft auch für Salizylat zu (s. Bild 3), ferner in besonders auffallender Weise für die H- und OH-Ionen, wofür im nächsten Abschnitt Belege gegeben werden.

Die Wirkungslosigkeit der Bestrahlung bei Suspension in Sulfatlösung während der Nachperiode ist auch für die Beurteilung der Frage von Bedeutung, ob die Kationenpermeabilität bestrahlter Erythrozyten auf „Umladung" der Zellmembran beruht. In der vorhergehenden Mitteilung wurde ein Versuch wiedergegeben, in dem sich die Geschwindigkeit des

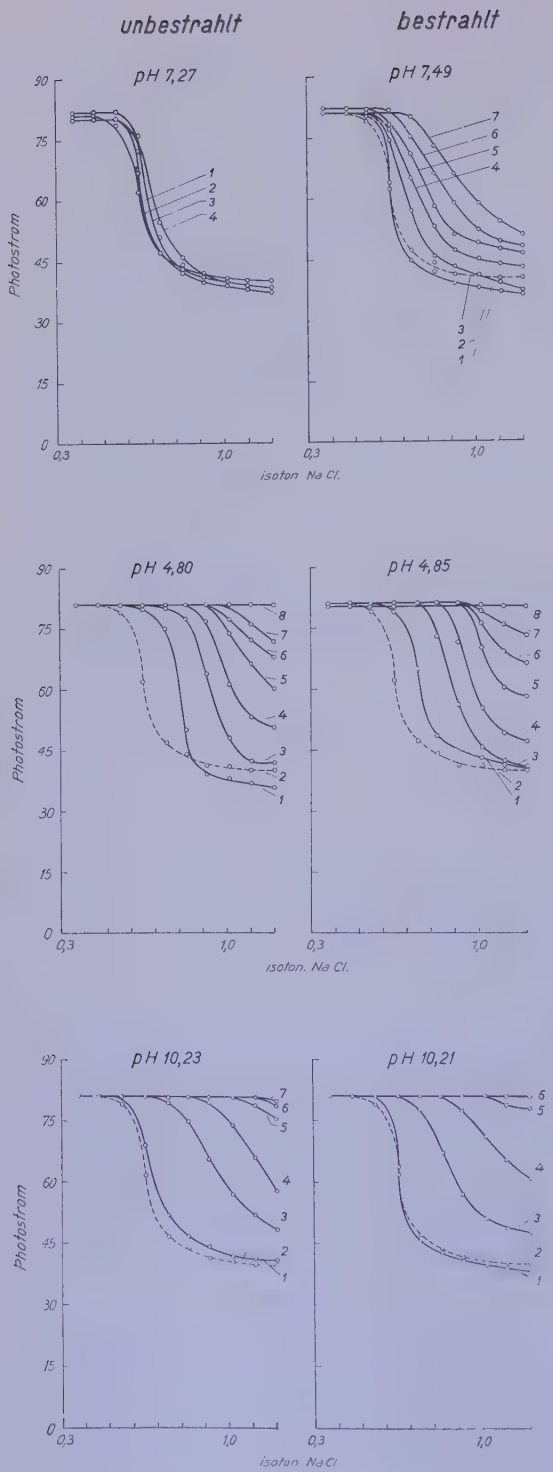

Bild 10

Anionenaustausches SO_4/Cl am bestrahlten Blut als nicht verändert erwies. Es wurde daraus geschlossen, daß die Anionenpermeabilität durch die Bestrahlung nicht abnimmt, so daß eine Membranumladung unwahrscheinlich ist. Es wurde aber schon erwähnt, daß in Sulfatlösung die Kationenpermeabilität ebenfalls sehr gering ist. Nachdem sich nun aber bei genauerer Untersuchung zeigt, daß es in Sulfatlösung überhaupt nicht zu Kationenpermeabilität kommt, muß die Frage der Membranladung auf anderem Wege untersucht werden.

D. Röntgenhämolyse und pH

Um den Einfluß des pH auf die Röntgenhämolyse zu prüfen, wurden Versuche nach dem oben im ersten Kapitel beschriebenen Vorgehen angestellt, von denen eine Reihe in Bild 10 dargestellt ist. Das Ergebnis ist prinzipiell das gleiche wie das im vorhergehenden Abschnitt mitgeteilte betreffend die Wirkung verschiedener Anionen, aber in noch ausgesprochenerer Weise: bei den pH-Werten, bei denen schon ohne Bestrahlung deutliche osmotische Schwellung eintritt, sowohl auf der sauren als auf der alkalischen Seite, bewirkt die Bestrahlung kaum mehr eine Erhöhung der

Schwellungsgeschwindigkeit, während in der Nähe des Neutralpunktes, wo das unbestrahlte Blut seine Resistenz kaum ändert, der Unterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Blut am ausgesprochensten ist. Vielleicht ist allgemein dann, wenn kräftige Eiweißdenaturantien auf die Zellmembran einwirken, vorhergehende Bestrahlung von geringer Wirkung, während sie die Membran gegen schwächere Denaturantien sensibilisiert.

E. Die Abhängigkeit der Röntgenhämolyse von der Salzkonzentration

Die Frage, wie die Schwellungsgeschwindigkeit sich mit der Salzkonzentration ändert, wurde aus zwei Gründen untersucht. Einmal wurden in einer anderen Mitteilung (Wilbrandt 1941) bei Untersuchung der Chloroformhämolyse Änderungen in der Form der Resistenzkurven gefunden, die auf höhere Schwellungsgeschwindigkeit in konzentrierten Lösungen zurückgeführt wurden, und es schien wünschenswert, diese Annahme an einem hämolytischen System mit langsamer Schwellung nachzuprüfen. Zweitens stießen Ting und Zirkle bei ihrer Berechnung der Kinetik der Röntgenhämolyse auf Widersprüche mit dem Experiment bei höheren Salzkonzentrationen.

Bild 11 zeigt Versuche in Kaliumchloridlösungen von vier verschiedenen Konzentrationen zwischen 1,0 und 2,2 isotonisch. Die Schwellungsgeschwindigkeit nimmt mit der verwendeten Salzkonzentration zu, und

---

Bildunterschriften zu nebenstehender Seite

Bild 10. Abhängigkeit der Röntgenhämolyse vom pH

Osmotische Resistenzen bestrahlten Blutes in isotonischer Kaliumchloridlösung.

Dosis: 45 000 r.

		Zeiten:							
Kurve Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	
pH 7,27	1	23	54	82	—	—	—	—	Stunden
pH 7,49	1	10,5	—	21,5	32,5	52,5	82,5	—	Stunden
pH 4,80	0	—	5	7	10	12	14,5	34	Stunden
pH 4,85	0	—	2,5	4,5	7,5	9,5	12	31,5	Stunden
pH 10,23	0	—	3	6	12	23	54	—	Stunden
pH 10,21	0	—	1,5	3,5	9,5	20,5	—	—	Stunden

Die gestrichelten Kurven geben die osmotische Resistenz einer Kontrollsuspension bei neutraler Reaktion wieder. Sie weichen von der Kurve „0 Stunden" bei saurer Reaktion nach links ab, weil erstens der Hämolysegrad mit abnehmendem pH zunimmt und zweitens schon bei der ersten Entnahme die Resistenz sich etwas verschoben hat. Bei alkalischer Reaktion kompensieren sich diese beiden Effekte, so daß eine geringere Abweichung resultiert.

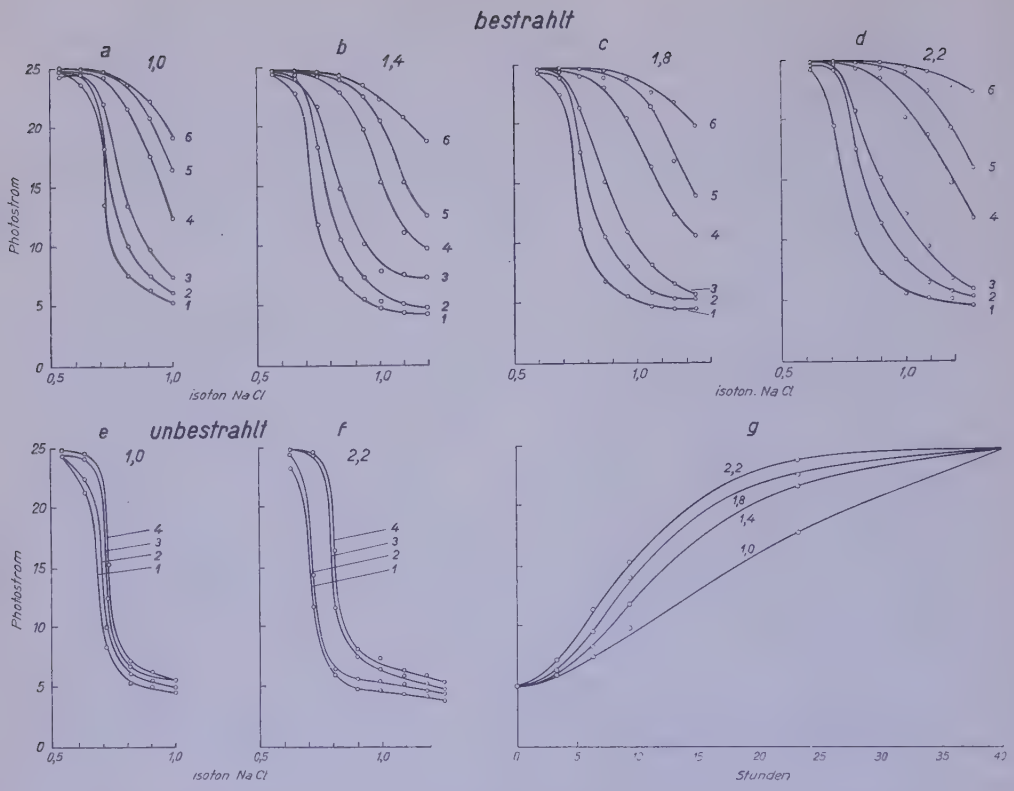

Bild 11. Abhängigkeit von der Salzkonzentration

Geschwindigkeit der osmotischen Schwellung bestrahlten und unbestrahlten Blutes in Kaliumchloridlösungen verschiedener Konzentrationen (1,0, 1,4, 1,8 und 2,2 isotonisch). Dosis: 35 000 r.

a—f) Resistenzkurven nach verschiedenen Zeiten.

	Zeiten:						
Kurve Nr.	1	2	3	4	5	6	
a—d	3	6	9	23	32	51	Stunden
e—f	3	9	32	51	—	—	Stunden

g) Zeitkurven für a—d: Ablesungen in 0,9 isotonisch NaCl gegen die Zeit aufgetragen.

zwar etwa proportional der Konzentration. Das zeigen deutlicher als die Resistenzkurven die Zeitkurven des Bild 11g, in denen aus den Resistenzkurven nur die Ablesungen in 0,9 isotonisch NaCl gegen die Zeit aufgetragen sind. Damit ist die bei der Deutung der Chloroformhämolyseversuche gemachte Annahme bestätigt. Auf die Beziehung zu der kinetischen Berechnung von Ting und Zirkle sei hier noch nicht eingegangen. Die mitgeteilten Versuche sollen später für eine ausführlichere Diskussion der Kinetik der kolloid-osmotischen Schwellung herangezogen werden.

3. Die Frage eines Hämolysins

Die oben ausgeführten Überlegungen sowie die erwähnten Schrifttumsangaben über die Rolle eines Hämolysins bei der Ultravioletthämolyse veranlaßte uns, zu untersuchen, ob Röntgenbestrahlung ein Hämolysin erzeugt, das die Röntgenhämolyse auslöst oder an ihrer Entstehung beteiligt ist.

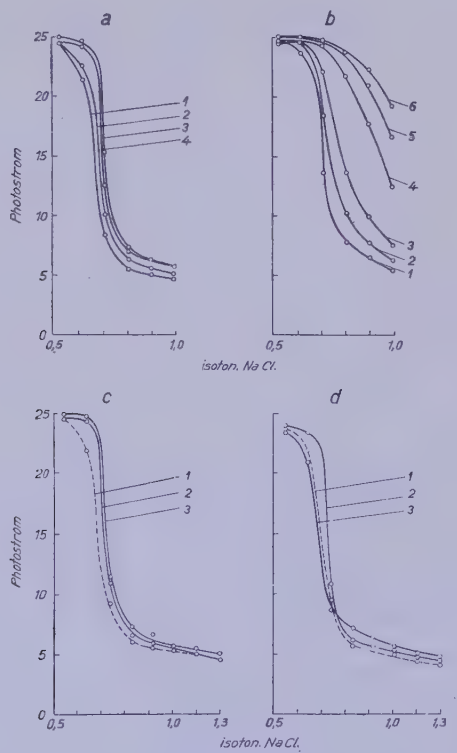

Bild 12. Versuch eines Hämolysinnachweises

a) Resistenzkurven unbestrahlten Blutes nach steigenden Zeiten.

b) Resistenzkurven bestrahlten Blutes (135 000 r) nach steigenden Zeiten.

c) Resistenzkurven unbestrahlten Blutes, nach 24 Stunden in der Salzlösung von a suspendiert, nach steigenden Zeiten.

d) Resistenzkurven unbestrahlten Blutes, nach 24 Stunden in der Salzlösung von b suspendiert, nach steigenden Zeiten.

	Zeiten:						
Kurve Nr.	1	2	3	4	5	6	
a)	3	9	32	51	—	—	Stunden
b)	3	6	9	23	32	51	Stunden
c)	7	28	50	—	—	—	Stunden
d)	28	50	74	—	—	—	Stunden

Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen. Blut wurde mit 135000 r bestrahlt, in isotonischer Kaliumchloridlösung suspendiert und seine osmotische Resistenz verfolgt. Nach 24 Stunden, als schon deutliche Hämolyse eingetreten war (s. Bild 12b), wurde ein Teil zentrifugiert, die überstehende Lösung abgehoben und in ihr eine gleiche Menge unbestrahlten Blutes suspendiert. Ebenso wurde mit unbestrahltem Blut verfahren. Die osmotische Resistenz der so erhaltenen Suspensionen wurde verfolgt. Sie veränderte sich praktisch überhaupt nicht, wie Bild 12 zeigt, und es trat auch keine Hämolyse ein. Die Bildung eines Hämolysins durch die Bestrahlung spielt also bei der Entstehung der Röntgenhämolyse keine Rolle. Über ähnliche Versuche nach Ultraviolettbestrahlung, die ebenfalls völlig negativ verliefen, wird in der folgenden Mitteilung berichtet werden.

Diskussion

Die Argumente, die für eine Eiweißdenaturierung als Basis der Permeabilitätsänderung nach Röntgenbestrahlung sprechen, lassen sich nun wie folgt zusammenfassen.

Erstens ist eine eiweißdenaturierende Wirkung von Röntgenstrahlen aus ultramikroskopischen Beobachtungen an Eiweißlösungen nach Röntgenbestrahlung wahrscheinlich geworden. Zweitens lösen alle Eiweißdenaturantien, die bisher darauf geprüft wurden, ebenfalls eine osmotische Hämolyse aus: Alkohol, Äther, Chloroform, Azeton, Hitze, Säure, Alkali, Rhodanid, Salizylat. Drittens ist die durch Salizylat verursachte Kationenpermeabilität reversibel, ebenso wie das für die Salizylatdenaturierung gezeigt wurde.

Kombiniert man Bestrahlung mit anderen Eiweißdenaturantien, so ergibt sich keine Addition der Wirkungen, sondern die Veränderung durch die Bestrahlung wird um so geringfügiger, je stärker die Wirkung des anderen eiweißdenaturierenden Agens ist. Dieses Verhalten wurde bisher bei Salzen und in besonders ausgeprägter Weise bei Säure und Alkali gefunden. Arbeitet man bei pH-Werten, bei denen ohne Bestrahlung die osmotische Schwellung schon verhältnismäßig rasch ist, so findet man zwischen bestrahltem und unbestrahltem Blut fast keinen Unterschied mehr.

Für den Mechanismus der Salzwirkungen ergibt sich nun folgendes Bild. Die während der Bestrahlung anwesenden Ionen sind praktisch irrelevant. Die Hämolysegeschwindigkeit hängt nur von den Ionen der Nachperiode ab. Von diesen wirken die Kationen hauptsächlich dadurch, daß ihre Diffusionsgeschwindigkeit limitierender Faktor für die osmotische Schwellung ist. Wieweit ihnen außerdem ein Einfluß auf die Membran-

permeabilität zuzuschreiben ist, läßt sich bisher noch nicht abgrenzen. Immerhin ergibt sich aus dem Verhalten in Magnesiumchloridlösung (siehe vorige Mitteilung), daß hier eine solche Wirkung nicht im Vordergrund steht. In dieser Lösung tritt nämlich gar keine Hämolyse ein, weil Magnesium nicht in die Zellen eindringt. Daß es das nicht tut, beruht aber nur darauf, daß das Magnesiumion zu groß ist, und nicht darauf, daß die Membran unter dem Einfluß des Magnesiums für Kationen undurchlässig bleibt, denn die einwertigen Kationen im Inneren der Zellen treten sehr rasch aus und es kommt zu der gleichen osmotischen Schrumpfung wie in Saccharoselösung.

Die Anionen wirken dagegen nur auf die Membranpermeabilität. Dieser Wirkung geht offenbar eine Adsorption an der Erythrozytenmembran voraus. Das wird erstens daraus wahrscheinlich, daß die Reihe, nach der sich die Anionenwirkung abstuft, die lyotrope Ionenreihe ist, wofür die Daten dieser Arbeit weitere Belege liefern. Der gleichen Reihe folgt aber auch die Adsorbierbarkeit der Ionen, wie sich aus ihrer Wirkung auf die Oberflächenspannung (Schrifttum s. Höber 1926) sowie aus direkten Messungen der Adsorption an Kohle (Michaelis c. s. Schrifttum s. Michaelis 1922) ergibt. Nach Freundlich beruht auch die Bedeutung der lyotropen Reihe für die Fällung hydrophober Sole auf einer vorgängigen Adsorption der Ionen. Ein weiterer wichtiger Hinweis für die Bedeutung der Adsorption bei der Röntgenhämolyse bildet die in der vorigen Mitteilung wiedergegebene merkwürdige Temperaturabhängigkeit: steigende Hämolysegeschwindigkeit bei Temperaturen unter 20° C, entsprechend der Steigerung der Adsorption bei tiefen Temperaturen, und dadurch Ausbildung eines Temperaturminimums der Hämolysegeschwindigkeit. Es ist eine der nächsten Aufgaben, zu prüfen, ob entsprechend dieser Vorstellung auch die Temperaturabhängigkeit bei verschiedenen Salzen der lyotropen Reihe verschieden verläuft. (Es sei hier noch ausdrücklich erwähnt, daß mit dem Ausdruck „Adsorption" nichts über die Bindungskräfte ausgesagt werden soll, die die Ionen fixieren.)

Die Annahme, daß die am Ende der lyotropen Reihe stehenden, als Eiweißdenaturantien bekannten Anionen Salizylat und Rhodanid durch Eiweißdenaturierung auf die Erythrozytenmembran wirken, wird durch den Nachweis der Reversibilität der Salizylatwirkung weiter gestützt.

Die in dieser Arbeit gezeigten qualitativ gleichen, quantitativ aber erheblich schwächeren Wirkungen von Nitrat und Chlorid am unbestrahlten Erythrozyten lassen es nun möglich erscheinen, daß auch diese Ionen in schwachem Maße denaturierend wirken. Es wurde in einer früheren Arbeit über Blutkonservierung (Wilbrandt 1940b) gezeigt, daß

die bei wochenlanger steriler Aufbewahrung von Blut eintretende Hämolyse osmotisch ist und durch Kationenpermeabilität zustande kommt. Austritt von Kalium aus konservierten Blutkörperchen ist auch von mehreren Seiten durch chemische Analyse gezeigt worden, u. a. von Willenegger. Offenbar ist auch hier die langsam einsetzende Durchlässigkeit für Kationen durch Eiweißdenaturierung bedingt. Dafür spricht auch die Beobachtung Willeneggers, daß der Kaliumaustritt eine auffallende Parallelität mit der Komplementinaktivierung zeigt. Die Annahme einer denaturierenden Wirkung auch der weniger wirksamen Ionen würde auf diese Weise zu einem einheitlichen Bild der Ionenwirkung führen.

Diese Vorstellung erklärt vielleicht auch eine merkwürdige Beobachtung Holthusens, daß nämlich Braunfärbung und Hämolyse nach Bestrahlung in umgekehrter Weise von der lyotropen Reihe bestimmt werden: die Hämolyse ist im Sulfat am schwächsten, die Braunfärbung am stärksten. Die Braunfärbung ist vermutlich hauptsächlich durch Methämoglobin bedingt. Der Zusammenhang ist wohl folgender: Denaturierung von Hämoglobin erfolgt auf dem Umweg über Methämoglobinbildung [Anson und Mirsky (1926)]. In Sulfatlösung ist die Denaturierung gehemmt und die Entwicklung bleibt auf der Stufe des Methämoglobins stehen. Die Denaturierung führt zu einem Produkt, das in der Farbe dem Hämoglobin näher steht als das Methämoglobin. In Rhodanidlösung erfolgt diese Umwandlung rasch und vollständig, so daß die braune Zwischenstufe des Methämoglobins kaum bemerkbar wird. Eine experimentelle Prüfung dieser Annahme ist geplant.

Daß die kombinierte Wirkung von Anionen und Bestrahlung nicht additiv ist, ergibt sich nicht nur aus der schon oben diskutierten Beobachtung, daß die Beschleunigung der Hämolyse durch die Bestrahlung bei den schwach denaturierenden einwertigen Anionen am stärksten und bei den stark denaturierenden nur geringgradig ist, sondern besonders auch durch den Nachweis, daß beim zweiwertigen Anion Sulfat gar keine Bestrahlungswirkung zu beobachten ist. Es würde sich vielleicht lohnen, therapeutische Versuche an diese Beobachtung anzuknüpfen, zumal die Wirkung in so ausgesprochener Weise in die Nachperiode fällt. Theoretisch ist die Beobachtung vor allem deshalb wichtig, weil sie bisher die Hauptstütze für die Vorstellung ist, daß die Bestrahlungswirkung möglicherweise überhaupt nicht unmittelbar denaturierend ist, sondern nur die Membran gegen die denaturierende Wirkung der Anionen sensibilisiert.

Die Form der osmotischen Resistenzkurven bestrahlten sowohl als unbestrahlten Blutes, die im Lauf dieser Arbeit beobachtet wurden, war sehr einheitlich: seitliche Verschiebung mit Abschrägung des steilen

Kurventeils, also osmotische Schwellung (oder Schrumpfung) mit Streuung der Geschwindigkeit (siehe vorige Mitteilung). Kombination osmotischer und nichtosmotischer Hämolyse wurde nur selten beobachtet. Gegenüber der etwaigen Annahme, auch die abgeschrägte Resistenzkurve könne eine solche Kombination sein, sei darauf hingewiesen, daß die Versuche mit Saccharose diese Deutung unwahrscheinlich machen. Die osmotische Verschiebung verläuft hier in umgekehrter Richtung, eine nichtosmotische Komponente müßte sich daher im nichthämolytischen Gebiet, das sich durch die Verschiebung der Resistenz noch verbreitert, sehr klar durch Hebung der ganzen Kurve zeigen. Das ist aber nicht oder erst in sehr späten Stadien der Fall.

Zusammenfassung

1. Die früher geäußerte Vermutung, die der Röntgenhämolyse zugrunde liegende Änderung der Ionenpermeabilität beruhe auf Eiweißdenaturierung an der Erythrozytenmembran, wurde durch folgende neue Beobachtungen gestützt. Ebenso wie Rhodanid bewirkt auch Salizylat sowohl Eiweißdenaturierung als auch Kationenpermeabilität des Erythrozyten, und die Änderung der Ionenpermeabilität durch Salizylat ist ebenso reversibel wie die Eiweißdenaturierung. Säure und Alkali, die ebenfalls Eiweiß denaturieren, verursachen auch Kationenpermeabilität, d. h. die Säure- und Alkalihämolyse sind kolloidosmotische Hämolysen.

2. Der „Zeitfaktor" bei Röntgenhämolyse ist kleiner als 1, d. h. die durch Bestrahlung gesetzte Änderung ist teilweise reversibel.

3. Die primäre Änderung besteht vermutlich nicht schon in einer Eiweißdenaturierung, sondern in einer Sensibilisierung der Membran gegen Denaturierung durch Ionen. Auch die schwach wirksamen Ionen Chlorid und Nitrat bewirken bei langer Beobachtung schon am unbestrahlten Blut osmotische Schwellung, Sulfat dagegen nicht. Bestrahlung verstärkt die Wirkung von Chlorid und Nitrat erheblich, während in Sulfatlösung gar keine osmotische Schwellung auch nach starker Bestrahlung eintritt.

4. Die Änderung durch Bestrahlung wirkt sich vor allem bei den an sich schwach wirksamen Ionen aus, während in Salizylatlösung der Unterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Blut geringer ist. Dasselbe gilt für das pH: der Unterschied ist stark bei neutraler Reaktion, wird aber bei pH 5 und pH 10, wo schon ohne Bestrahlung osmotische Schwellung erfolgt, sehr gering. Die kombinierte Wirkung von Bestrahlung und anderen Eiweißdenaturantien ist in diesen Fällen also nicht additiv.

5. Die während der Bestrahlung anwesenden Ionen üben keinen nachweisbaren Einfluß auf das Bestrahlungsergebnis aus, nur die Ionen der Nachperiode sind von Bedeutung.

6. In Saccharoselösung kommt es in Übereinstimmung mit dem Befund von Ting und Zirkle nicht zu osmotischer Schwellung. Dagegen zeigt sich auch hier die Ionenpermeabilitätsänderung darin, daß der in Nichtleiterlösung auch ohne Bestrahlung erfolgende Salzaustritt durch Bestrahlung beträchtlich beschleunigt wird.

7. Die Entstehung eines hämolysierenden Stoffes bei Röntgenbestrahlung hat sich nicht nachweisen lassen.

8. Die Schwellungsgeschwindigkeit in Kaliumchloridlösung ist der Salzkonzentration etwa proportional.

*

Wir verdanken die Durchführung der ausgedehnten Versuche z. T. der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Bernischen Hochschule, und wir möchten nicht verfehlen, dieser Institution auch an dieser Stelle den besten Dank auszusprechen.

Schrifttum

Anson u. Mirsky, J. Gen. Physiol. 9 (1926): 169; 17 (1934): 399. — Davson, H., Biochem. J. 33 (1939): 389. — Freundlich, Kapillarchemie. Leipzig 1930. — Giaume, C., u. S. Poulon, Pathologica (Genova) 21 (1929): 474. Ref. Radiologie 8, 8. — Höber, R., Physikal. Chemie der Zellen und Gewebe. Leipzig 1926. — Holthusen, H., Fschr. Röntgenstr. 29 (1922): 777. — Koeppe, H., Strahlenther. 23 (1926): 671. — Liechti, A., u. W. Wilbrandt, Strahlenther. 70 (1941): 541. — Michaelis, L., Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1922 (daselbst Schrifttum). — Rajewsky, Strahlenther. 33 (1929): 362. — Ting, T. P., u. R. E. Zirkle, J. cellul. a comp. Physiol. 16 (1940): 189 u. 197. — Wilbrandt, W., Pflügers Arch. 241 (1938): 289; 243 (1940a): 537; 245 (1941): 22. / Schweiz. med. Wschr. 1940b: 731. — Willenegger u. Ottersooser, Schweiz. med. Wschr. 70 (1940): 437.